

枣不同基因型在体愈伤芽再生能力评价 与同质多倍体新种质创制

王利虎^{1,2}, 胡 兰¹, 李登科², 刘 平^{1,2}, 刘孟军^{1,3}

(¹河北农业大学中国枣研究中心, 保定 071001; ²果树种质创制与利用山西省重点实验室, 太原 030031;

³北京林果业生态环境功能提升协同创新中心, 北京 100000)

摘要:枣树田间在体愈伤途径同质多倍体诱导新技术可有效避免倍性嵌合体产生, 快速获得纯多倍体。在体愈伤芽再生是该技术成功应用的基础。利用该技术, 对 115 个枣和 4 个酸枣基因型的田间愈伤芽再生能力进行了评价, 并对 4 个枣基因型进行了多倍体诱导。结果表明, 94.78% 的枣基因型和 100% 的酸枣基因型可诱导出愈伤组织, 80% 的枣基因型和 100% 的酸枣基因型实现了芽再生。不同枣基因型间出愈率存在显著差异, 变幅为 0~100%, 平均出愈率为 76.48%, 变异系数为 37%; 基于出愈率将供试基因型分为 5 类, 即易出愈伤、较易出愈伤、较难出愈伤、难出愈伤和不出愈伤基因型。不同基因型的平均单枝截面出芽数差异显著(0~10.33 个), 平均出芽数为 1.84; 据出芽率也可将供试基因型分为 5 类, 即易出芽、较易出芽、较难出芽、难出芽和不出芽基因型。出愈率和出芽率没有显著相关性, 易出愈伤的基因型不一定易出芽。利用田间愈伤途径同质多倍体诱导新技术, 获得了乐金 1 号、宁夏长枣、运城婆婆枣 3 个枣品种的纯四倍体新种质和磨盘枣的纯三倍体新种质。

关键词: 枣; 酸枣; 在体诱导; 芽再生; 多倍体

In vivo Bud Regeneration Ability and Homogeneous Polyploid Induction via Callus of Different Jujube Genotypes

WANG Li-hu^{1,2}, HU Lan¹, LI Deng-ke², LIU Ping^{1,2}, LIU Meng-jun^{1,3}

(¹Research Center of Chinese Jujube, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001;

²Shanxi Key Laboratory of Germplasm Improvement and Utilization in Pomology, Taiyuan 030031;

³Beijing Collaborative Innovation Center for Eco-environmental Improvement with Forestry and Fruit Trees, Beijing 100000)

Abstract: The novel approach we created for *in vivo* induction of homogeneous autopolyploid (IVIHA) via callus could effectively avoid mixploid formation and rapidly obtain pure polyploid in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.). *In vivo* bud regeneration via callus (IVBR) is the basis of successful application of this new approach. Using this approach, the abilities of IVBR of 115 Chinese jujube genotypes and 4 sour jujube (*Z. acidojujuba* Cheng et Liu), the wild ancestor of Chinese jujube, were evaluated, and 4 genotypes of Chinese jujube were chosen for polyploid induction. The results showed that 94.78% Chinese jujube genotypes and 100% sour jujube genotypes formed calluses, and 80% Chinese jujube genotypes and 100% sour jujube genotypes regenerated buds via callus. The callus formation ratio differed with genotypes, ranged from 0-100%, averaged of 76.48% with variation coefficient of 37%. Based on callus formation ratio the tested genotypes were classified into 5 groups, i. e., genotypes easy for callus formation, genotypes less easy for callus formation, genotypes less difficult for callus formation, genotypes difficult for

收稿日期: 2016-01-22 修回日期: 2016-06-20 网络出版日期: 2016-12-14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20161214.1433.024.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372029); 河北省百名优秀创新人才支持计划(II)(2014-2016); 河北省自然科学基金(C2014204047); 山西省重点实验室开放基金课题(2015012001-12)

第一作者研究方向为干果种质资源与分子辅助育种。E-mail: hdwanglh@163.com

通信作者: 刘孟军, 研究方向为干果种质资源与分子辅助育种。E-mail: lmj1234567@aliyun.com

刘平, 研究方向为干果种质资源与分子辅助育种。E-mail: yyip@hebau.edu.cn

callus formation and genotypes with no callus formation. The bud regeneration rate (average bud number per branch cross section) was also significantly different (0-10.33) among genotypes with average of 1.84, and thereby the tested genotypes were divided into 5 groups according to their bud regeneration rate. There is no significant co-relationship between callus formation ratio and bud regeneration rate, in other words, genotypes with high callus formation ratios not always have high bud regeneration rates. With the IVIHA approach (combining *in vivo* bud regeneration via callus with colchicines inducement), pure tetraploid germplasms of 3 Chinese jujube genotypes (Leling 1, Ningxiachangzao, Yunchengpopozao) and 1 pure triploid germplasm (Mopanzao) were firstly created.

Key words: Chinese jujube; sour jujube; *in vivo* induction; bud regeneration; polyploid

枣树 (*Ziziphus jujuba* Mill.) 为鼠李科 (Rhamnaceae) 枣属 (*Ziziphus* Mill.) 植物, 是我国原产特色优势果树^[1-3]。我国现有的枣树主要栽培品种大多存在明显缺陷, 培育综合性状优良的新品种势在必行^[4]。枣树由于花小、去雄难、自然坐果率低^[5], 加之普遍胚败育率很高^[6], 严重阻碍了枣树的杂交育种。多倍体植物通常具有果实大、光合能力强、抗性强等诸多优良特性^[7-8], 多倍体育种受到了许多育种学家的青睐。经人工诱导, 已在粮食作物^[9]、果树^[10-13]等植物上建立了多倍体诱变方法并获得了多倍体新品种、新种质。本研究团队自 20 世纪末起持续开展了枣和酸枣(枣的直系野生种)的秋水仙素诱变无性多倍化育种工作^[14-17], 成功获得了枣树的一批多倍体新种质。但是在以往的多倍体诱变方法中, 育种周期长, 易产生嵌合体且纯化困难, 这也成为了果树传统多倍体诱变育种中的瓶颈问题^[17-19]。鉴于此, 本研究团队在总结多年的理论和实践的基础上建立了田间在体免嵌合体纯化多倍体诱变技术体系^[20-23], 即融合了秋水仙素诱导愈伤细

胞可获得纯多倍体再生芽、在体诱变后再生芽生长快的优势, 实现了当年获得纯多倍体并开花, 可缩短育种周期 2 年以上。而该新技术的关键是田间在体途径芽再生技术。本研究将前期建立的田间在体途径芽再生技术应用于 119 个枣和酸枣的基因型, 并结合秋水仙素诱变进行了 4 个枣品种的多倍体新种质创制, 旨在揭示基因型对枣田间在体途径芽再生的影响, 并获得多倍体枣树新种质。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料种植于山西省农业科学院果树研究所国家枣种质资源圃(山西省太谷县), 树龄 8 年生, 管理水平较高。供试材料包括枣 (*Ziziphus jujuba* Mill.) 的主栽品种、新选育品种、地方名特优品种、韩国引进品种, 及枣的野生种酸枣 (*Z. acidojujuba* Cheng et Liu) 的 4 个基因型(北京酸枣、太谷大酸枣、大老虎眼酸枣和野酸枣), 共 119 个基因型(表 1)。

表 1 不同基因型的出愈率和芽再生能力

Table 1 Callus formation ratio and bud regeneration ability of different genotypes

基因型 Genotype	出愈率(%) CFR	平均单枝截面 出芽数(个)ABN	基因型 Genotype	出愈率(%) CFR	平均单枝截面 出芽数(个)ABN
北京酸枣	100.00	10.33	无等	80.00	3.80
龙壶枣	100.00	9.40	运城婆婆枣	80.00	2.40
北京马牙枣	100.00	8.00	乐金 4 号	80.00	0.80
平陆尖枣	100.00	7.60	壶瓶枣	80.00	0.80
夏县圆脆枣	100.00	7.00	五台木枣	80.00	0.80
河南龙枣	100.00	7.00	圆铃 1 号	80.00	0.50
北京嘎嘎枣	100.00	5.70	五台面枣	80.00	0.20
怀柔脆枣	100.00	5.33	小平顶	80.00	0
北京鸡蛋枣	100.00	5.00	北京泡泡枣	75.00	4.75
驻马店羊角枣	100.00	5.00	河北无核	75.00	4.00

表 1(续)

基因型 Genotype	出愈率(%) CFR	平均单枝截面 出芽数(个)ABN	基因型 Genotype	出愈率(%) CFR	平均单枝截面 出芽数(个)ABN
北京黍黍枣	100.00	5.00	稷山圆枣	75.00	2.00
金铃长枣	100.00	4.75	襄汾崖枣	75.00	1.20
榆次奶头枣	100.00	4.20	太谷葫芦枣	75.00	1.00
京枣 39 号	100.00	3.50	茶壶枣	75.00	0.75
太谷铃铃枣	100.00	3.20	大荔龙枣	75.00	0.75
鲍庄尖枣	100.00	3.20	赞皇大枣	75.00	0.25
福枣	100.00	3.00	马铃薯	75.00	0
长辛店白枣	100.00	3.00	定襄星星枣	75.00	0
逐鹿悠悠枣	100.00	3.00	美蜜枣	70.00	1.60
枣庄贡枣	100.00	2.80	蜂蜜罐	70.00	0
官滩 1 号	100.00	2.80	洪赵十月红	66.67	4.67
冷白玉	100.00	2.75	临汾蜜枣	66.67	3.67
北京花生枣	100.00	2.60	夏县紫圆枣	66.67	2.00
大白铃	100.00	2.60	朝阳无核	66.67	1.33
月初	100.00	2.40	石楼帅枣	66.67	1.00
洪赵小枣	100.00	2.00	锦绣	66.67	0.67
临猗牙枣	100.00	1.90	苹果枣	66.67	0
宁夏长枣	100.00	1.80	山东辣椒枣	66.67	0
溱浦鸡蛋枣	100.00	1.67	临汾团枣	60.00	2.40
苏子峪蜜枣	100.00	1.60	太谷大酸枣	60.00	1.40
骏枣	100.00	1.60	晋赞大枣	60.00	1.00
野酸枣	100.00	1.50	五台沃地枣	60.00	0.80
成武冬枣	100.00	1.50	胎里红	60.00	0.80
七月鲜	100.00	1.50	山东梨枣	60.00	0.60
官滩枣	100.00	1.40	乐金 3 号	60.00	0.40
朝阳金丝蜜	100.00	1.20	五台醋枣	60.00	0.40
乐金 1 号	100.00	1.20	太谷郎枣	60.00	0
洪赵脆枣	100.00	1.00	朝阳大尖顶	50.00	4.75
临猗梨枣	100.00	0.80	朝阳小圆铃	50.00	2.25
相枣	100.00	0.75	灰枣	50.00	1.25
文水沙枣	100.00	0.60	姜闯 2 号	50.00	0.75
官滩 2 号	100.00	0.60	六月鲜	50.00	0.25
金丝 4 号	100.00	0.60	襄汾圆枣	50.00	0.20
乐金 2 号	100.00	0.33	京枣 31	50.00	0
庆云小梨枣	100.00	0.33	朝阳凌枣	50.00	0
大老虎眼酸枣	100.00	0.30	根德大枣	40.00	0.40
壶瓶酸	100.00	0.20	鸡心蜜枣	40.00	0.20
交城端枣	100.00	0.20	朝阳磨盘枣	40.00	0.20
平顺笨枣	100.00	0	朝阳小尖顶	33.33	1.33
交城牙枣	100.00	0	金谷大枣	33.33	0.33

表 1(续)

基因型 Genotype	出愈率(%) CFR	平均单枝截面 出芽数(个)ABN	基因型 Genotype	出愈率(%) CFR	平均单枝截面 出芽数(个)ABN
平陆屯屯枣	100.00	0	户县太平水枣	20.00	0.60
保德油枣	100.00	0	乾陵大枣	20.00	0.20
临汾针葫芦	100.00	0	洪赵葫芦枣	20.00	0
乐陵无核2号	100.00	0	珍珠龙珠	20.00	0
黎城小枣	91.67	1.00	鸡心枣	0	0
蛤蟆枣	90.00	0.60	过雁红	0	0
板枣	90.00	0.30	红颜	0	0
磨盘枣	80.00	7.60	晋枣	0	0
大馍枣	80.00	7.40	太谷没心红	0	0
新蔡大圆丰	0	0			

CFR: Callus formation ratio, ABN: Average bud number per branch cross section

1.2 试验方法

1.2.1 田间愈伤组织诱导和芽再生

参考 Q. H. Shi 等^[23]的方法,于 2013 年 5 月,对供试基因型随机选取二年生健壮枝条进行截枝处理,用

1.5 mL 诱导剂(4.0 mg/L TDZ + 2.0 mg/L AgNO₃)处理截面形成层 24 h,之后覆盖泥土保湿,直至芽长度达 2 cm。单枝重复 5~10 次。过程如图 1 所示。



A: 截枝(箭头所示为形成层);B: 诱导剂处理;C: 保湿;D: 愈伤组织形成;E: 芽再生
A: Branch cross section (cambium showed by arrow), B: Inductive reagent application,
C: Moisture keeping, D: Callus formation, E: Bud regeneration

图 1 愈伤组织诱导和芽再生过程

Fig. 1 The process of *in vivo* callus induction and bud regeneration

1.2.2 愈伤组织诱导情况调查

于愈伤诱导后 20 d,调查出愈率。出愈率 = (出愈伤组织枝条数/处理枝条总数) × 100%。

1.2.3 芽再生能力分类

芽再生能力用平均单枝截面出芽数表示。于愈伤诱导后 50 d,对各供试基因型的单枝截面出芽数进行调查,平均单枝截面出芽数 = 出芽总数/处理枝条数量。

1.2.4 多倍体种质创制

利用田间在体免嵌合体

纯化多倍体诱变技术创制多倍体新种质,多倍体诱导方法同 Q. H. Shi 等^[23]。选取的枣基因型为乐金 1 号、运城婆婆枣、宁夏长枣、磨盘枣。种质倍性检测在中国科学院植物研究所完成,样品采集及处理方法同 Q. H. Shi 等^[23],仪器为 BECKMAN COULTER 公司生产的 MoFlo XDP 流式细胞仪。

1.3 数据分析

采用 SPSS STATISTICS 17.0 数据处理系统进

行统计分析,对出愈率和单枝截面出芽数做次数分布图,并采用 SPSS 软件进行正态性检测(采用 K-S 检验)。根据出愈率和单枝截面出芽数分别对供试基因型进行分类。

2 结果与分析

2.1 不同基因型对愈伤组织诱导的影响

对出愈率情况进行统计表明,在供试的 119 个基因型中,出愈伤的 113 个(包括全部的 4 个酸枣基

因型),占 94.95%。从表 1 可看出,不同基因型的出愈难易差异性显著,变幅为 0~100%,平均出愈率为 76.48%,变异系数为 37%。将出愈率值从小到大进行排序,并等分成 10 级,统计落入各级的基因型数,绘制出了出愈率的次数分布图。从图 2 可以看出,出愈率次数分布图近似于倒“L”型,出愈率高的基因型数量偏多。K-S 检验表明,不符合正态分布(Z 值=2.728)。

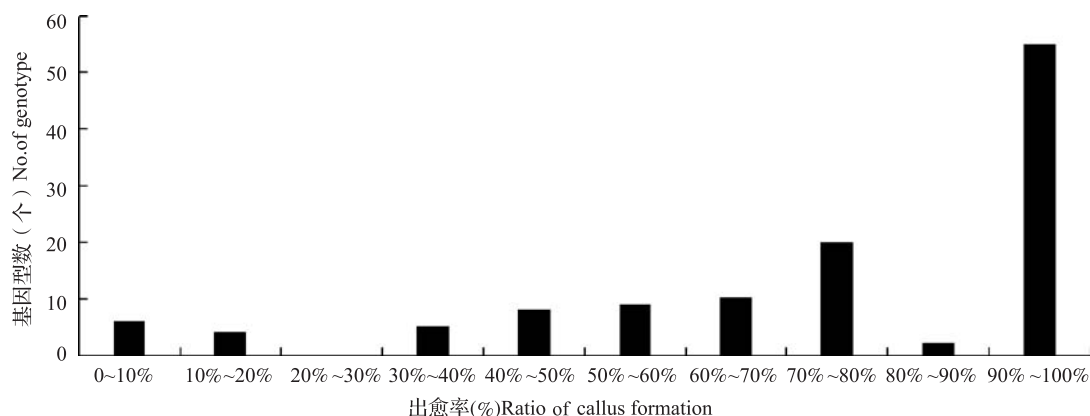


图 2 基于出愈率的基因型次数分布图

Fig. 2 Frequency distribution diagram of genotype based on the ratio of callus formation

根据出愈率大小,可将基因型分为 5 类(表 1), A: 易出愈伤基因型, $75\% < \text{出愈率} \leq 100\%$; B: 较易出愈伤基因型, $50\% < \text{出愈率} \leq 75\%$; C: 较难出愈伤基因型, $25\% < \text{出愈率} \leq 50\%$; D: 难出愈伤基因型, $0 < \text{出愈率} \leq 25\%$; E: 不出愈伤基因型, 出愈率为 0。

在供试的 119 个基因型中, A 类基因型有 67 个,占 56.30%; B 类 29 个,占 24.37%; C 类 13 个,占 10.92%; D 类 4 个,占 3.36%; E 类 6 个,分别为晋枣、红颜、新蔡大圆丰、太谷没心红、过雁红、鸡心枣,占 5.05%。供试酸枣相对于枣树更容易出愈伤,其中北京酸枣、野酸枣、大老虎眼酸枣属于易出愈伤基因型,太谷大酸枣属于较易出愈伤基因型。

2.2 不同基因型对芽再生能力的影响

在 119 个供试基因型中,出芽的共 96 个(包括全部 4 个酸枣基因型),占 80.67%(表 1)。不同基因型的芽再生能力存在明显差异(表 1),平均单枝截面出芽数从 0~10.33 不等,平均出芽数为 1.84。可见,芽再生能力在不同的基因型中也表现出丰富的多样性。将平均单枝截面出芽数从小到大进行排序,并等分成 10 级,统计落入各级的基因型数,绘制出了平均单枝截面出芽数的次数分布图(图 3)。

从图 3 可以看出,平均单枝截面出芽数的次数分布图近似于“L”型,与出愈率的次数分布图正好相反,出芽数少的基因型居多数。对单枝截面出芽数的次数分布进行正态性检测(采用 K-S 检验), Z 值为 2.228,不符合正态分布。

根据平均单枝截面出芽数,可将供试基因型分为 5 类, I 类: 易出芽基因型,平均单枝截面出芽数 > 3.0 ; II 类: 较易出芽基因型, $2.0 < \text{平均单枝截面出芽数} \leq 3.0$; III 类: 较难出芽基因型, $1.0 < \text{平均单枝截面出芽数} \leq 2.0$; IV 类: 难出芽基因型, $0 < \text{平均单枝截面出芽数} \leq 1.0$; V 类: 不出芽基因型,平均单枝截面出芽数为 0。

其中, I 类基因型有 24 个,占 20.17%,平均单枝截面出芽数为 5.62; II 类基因型 12 个,占 10.08%,平均单枝截面出芽数为 2.67; III 类基因型 20 个,占 16.81%,平均单枝截面出芽数为 1.55; IV 类基因型 40 个,占 33.61%,平均单枝截面出芽数为 0.56; 23 个基因型没有芽再生,为第 V 类,占 19.33%。

2.3 田间愈伤组织途径多倍体种质创新

通过对磨盘枣(易出愈伤易出芽基因型)、运城婆婆枣(易出愈伤较易出芽基因型)、乐金 1 号(易

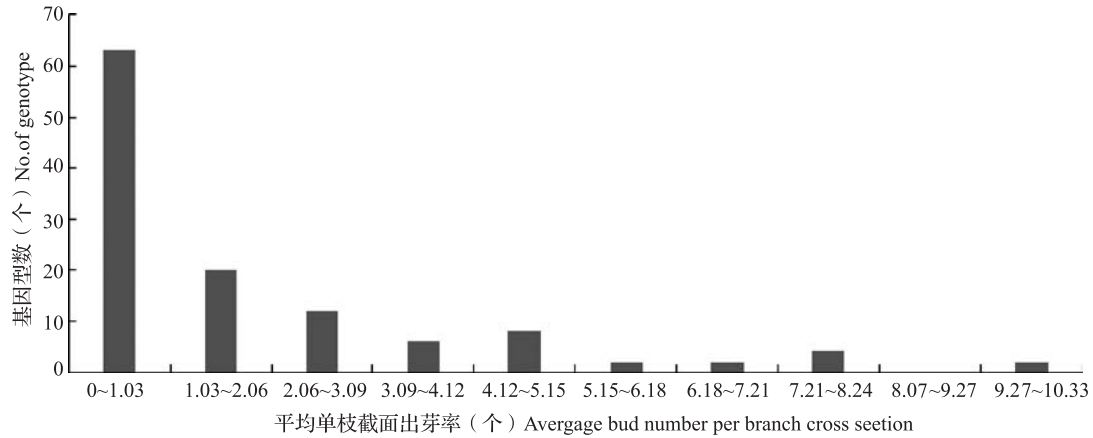
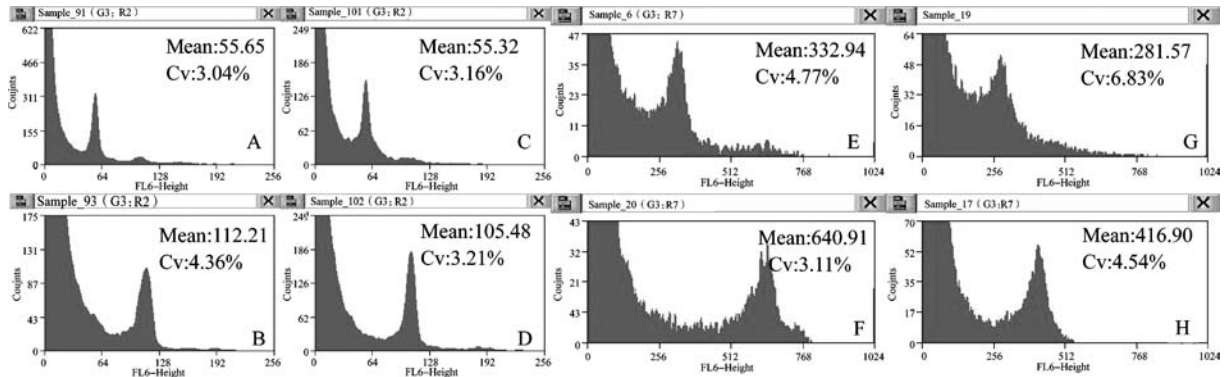


图3 基于芽再生能力的基因型次数分布图

Fig. 3 Frequency distribution diagram of genotype based on bud regeneration ability

出愈伤较难出芽基因型)、宁夏长枣(易出愈伤较难出芽基因型)4个枣品种进行田间愈伤途径秋水仙素多倍体诱导,分别获得了它们的多倍体再生芽。

经过流式细胞仪测定,乐金1号、运城婆婆枣、宁夏长枣的变异芽为纯四倍体,磨盘枣的再生芽为纯三倍体(图4)。



A:乐金1号(2x);B:乐金1号(4x);C:运城婆婆枣(2x);D:运城婆婆枣(4x); E:宁夏长枣(2x);F:宁夏长枣(4x);G:磨盘枣(2x);H:磨盘枣(3x) A: Lejin1 (2x); B:Lejin1 (4x), C: Yunchengpopozao (2x), D: Yunchengpopozao (4x), E: Ningxiachangzao (2x), F:Ningxiachangzao (3x), G: Mopanzao (2x), H: Mopanzao (3x)

图4 不同枣品种秋水仙素诱导后再生芽倍性的流式细胞仪鉴定结果

Fig. 4 Ploidy detection by FCM of the regenerated buds of different Chinese jujube genotypes induced by colchicine

3 讨论与结论

3.1 基因型对芽再生能力的影响

不同基因型的芽再生能力存在一定的差异。邢文等^[24]通过对4种玫瑰叶片芽再生进行研究发现,4种玫瑰叶片的芽再生能力存在差异,最高达70%,最低为36.5%。在本研究中也发现了相同的情况,供试4个酸枣的平均单枝截面出芽数从0.3个到10.33个不等;不同枣基因型芽再生能力差异性显著,龙壶枣的平均单枝截面出芽数达9.40个,但还有19.33%的基因型未实现芽再生,可见基因型不

同,其遗传组成不同,从而其最佳的出芽诱导条件也不同。因此,对于芽再生能力差异的内在机制及更优化的芽再生条件有待进一步研究。

3.2 非整数加倍现象

在本研究中发现,二倍体枣经秋水仙素诱变后直接获得纯三倍体,类似的情况在我们以往的研究中也曾出现过,出现比例接近5%。在梨和油棕的多倍体诱变育种中,也有报道^[25-26]。对于非整数加倍现象的发生机制,目前尚不明确,可能是在愈伤组织细胞分裂时期,由于秋水仙素或气候条件,如高温、低温、降水等的影响,诱导产生的多倍体细胞染

染色体发生畸变丢失一部分染色体或者二倍体细胞得到一部分染色体。

枣田间愈伤途径芽再生技术在供试 115 个枣和 4 个酸枣基因型间具有良好通用性,95% 的枣基因型和 100% 的酸枣基因型可诱导出愈伤组织,80.67% 的枣基因型和 100% 的酸枣基因型实现了芽再生,但不同基因型间出愈率和出芽数差异显著。综合利用田间在体途径芽再生技术和秋水仙素诱变技术,首次获得了二倍体乐金 1 号、运城婆婆枣、宁夏长枣的纯四倍体新种质及二倍体磨盘枣的纯三倍体新种质。

参考文献

- [1] 曲泽洲,王永蕙.中国果树志·枣卷[M].北京:中国林业出版社,1993:5-7
- [2] 刘孟军,汪民.中国枣种质资源[M].北京:中国林业出版社,2009:86-87
- [3] 闫超,刘平,刘孟军.枣品种结实特性研究[J].植物遗传资源学报,2009,10(1):121-125
- [4] 刘孟军,王玖瑞,刘平,等.枣树免去雄杂交育种的设计与实践[J].园艺学报,2014,41(7):1495-1502
- [5] 刘玲,王玖瑞,刘孟军.枣不同品种花粉量和花粉萌发率的研究[J].植物遗传资源学报,2006,7(3):338-341
- [6] 祁业凤,刘孟军.枣的胚败育及幼胚培养研究[J].园艺学报,2004,31(1):78-80
- [7] 韦荣昌,吴庆华,马小军,等.植物多倍体的研究进展[J].种子,2013,32(7):50-52
- [8] 于永畅,王厚新,李承秀,等.四倍体与二倍体紫薇光合特性研究[J].中国农学通报,2013,29(22):10-14
- [9] 郭秀平,秦瑞珍,陈旭.同源四倍体水稻原种制备及影响因素分析[J].植物遗传资源学报,2002,3(3):30-33
- [10] Huseyin T, Fevziye C T, Ali R A. Induction of tetraploid plants from standard watermelon (*Citrullus lanatus*) cultivars [J]. Poster Present Curr Opin Biotechnol, 2013, 24 : 126-143
- [11] Iraci S, Daniela D B, Neiva I P, et al. Improving *in vitro* induction of autopolyploidy in grapevine seedless cultivars [J]. Euphytica, 2014, 196:299-311
- [12] Kamnoon K, Korn K. *In vitro* induction of tetraploid plants from callus cultures of diploid bananas (*Musa acuminata*, AA group) 'Kluai Leb Mu Nang' and 'Kluai Sa' [J]. Euphytica, 2012, 183 :111-117
- [13] Wu J H. Seed attributes in fruit of colchicine-induced tetraploids of *Actinidia chinensis* [J]. Scient Horticult, 2014, 172:265-270
- [14] 蒋洪恩,刘孟军.秋水仙碱诱导枣多倍体的研究[J].园艺学报,2004,31(5):647-650
- [15] 王娜,刘孟军.秋水仙素离体诱导冬枣和酸枣四倍体[J].园艺学报,2005,32(6):1008-1012
- [16] 魏薇,韩晶,刘孟军,等.枣离体叶片不定芽的诱导[J].河北农业大学学报,2012,35(6):51-54
- [17] 刘孟军,刘平,王玖瑞,等.枣田间愈伤组织途径免疫合体纯化快速诱导同源多倍体[J].园艺学报,2013,40(S):2610
- [18] 石庆华,刘平,刘孟军.果树倍性育种研究进展[J].园艺学报,2012,39(9):1639-1654
- [19] Shao J Z, Chen C, Deng X X. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*) [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2003, 75:241-246
- [20] 宁强,刘孟军,刘晓光,等.枣愈伤途径诱导多倍体[J].河北农业大学学报,2008,31(1):29-32
- [21] 徐娟,王玖瑞,刘孟军,等.田间枣树愈伤组织诱导及不定芽的发生[J].河北农业大学学报,2010,34(6):40-45
- [22] Shi Q H, Liu P, Wang J R. A novel *in vivo* shoot regeneration system via callus in woody fruit tree Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) [J]. Scient Horticult, 2015, 188:30-35
- [23] Shi Q H, Liu P, Liu M J, et al. A novel method for rapid *in vivo* induction of homogeneous polyploids via calluses in a woody fruit tree (*Ziziphus jujuba* Mill.) [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2015, doi: 10.1007/s11240-015-0713
- [24] 邢文,包颖,丁萌,等.玫瑰叶片直接再生及其影响因素[J].华中农业大学学报,2014,33(1):29-34
- [25] Sun Q R, Sun H Y, Li L G, et al. *In vitro* colchicine-induced polyploid plantlet production and regeneration from leaf explants of the diploid pear (*Pyrus communis* L.) cultivar, 'Fertility' [J]. J Horticult Sci Biotechnol, 2009, 84(5):548-552
- [26] Madon M, Clyde M M, Hashim H, et al. Polyploid induction of oil palm through colchicine and oryzal in treatments [J]. J Oil Palm Res, 2005, 17:110-123